

ESTUDO CLÍNICO RANDOMIZADO DUPLO-CEGO COM CÉLULAS-TRONCO ALOGÊNICAS NO TRATAMENTO DE FÍSTULAS PERIANAIS EM PACIENTES COM DOENÇA DE CROHN

Iago de Melo Fontana¹, Valdomiro Garbugio Filho², Eduardo Endo³, Barbara Pereira De Lara⁴, Layane Pimenta Baldon Abdallah⁴

¹Acadêmico do Curso de Medicina, UNICESUMAR – Universidade Cesumar, Maringá/PR. Bolsista PIBIC/ICETI-UniCesumar. iagofontana@gmail.com

²Orientador, Mestre, Médico Gastroenterologista, Docente do Departamento de Medicina, UNICESUMAR. Pesquisador do Instituto Cesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação – ICETI. valdomiro.filho@unicesumar.edu.br

³Coorientador, Docente do Curso de Medicina, UNICESUMAR, Maringá/PR. eduardo.endo@unicesumar.edu.br

⁴Residente e Pesquisadora em Coloproctologia

RESUMO

Após a virada do século XXI, as doenças inflamatórias intestinais se tornaram doenças globais com incidências aceleradas em países recentemente industrializados. Dentro delas destaca-se a Doença de Crohn, caracterizada por inflamação do trato digestivo, geralmente transmural, podendo apresentar fístulas perianais complexas. Sabe-se que as fístulas perianais são frequentes e afetam criticamente a qualidade de vida do paciente devido à ocorrência de dor, incontinência fecal, constrangimento pessoal e o comprometimento das funções físicas e sexuais. Cerca de 80% das fístulas perianais são complexas e são difíceis de tratar, uma vez que são particularmente refratárias às estratégias de tratamento clínico convencionais. A injeção de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo no trajeto fistuloso é uma abordagem nova e promissora para o tratamento dessas fístulas, devido aos seus efeitos imunomoduladores e anti-inflamatórios. Atualmente o tratamento das fístulas anais é realizado com imunobiológicos, os quais possuem alto custo para o sistema de saúde. Essa pesquisa tem como objetivo geral comparar a capacidade de células tronco do tecido adiposo com placebo no tratamento de fístulas perianais em pacientes com Doença de Crohn. Para tanto, será realizado um estudo do tipo randomizado duplo cego com análise de regressão logística de medidas repetidas. Posteriormente será realizada a avaliação dos dados obtidos e da possível diferença encontrada entre os grupos utilizando regressão logística com medidas repetidas. Espera-se, portanto, que este estudo traga uma nova modalidade terapêutica e que interfira positivamente no processo de cura destes pacientes. Acrescenta-se ainda, o fato dos resultados deste projeto servirem de base para futuras metanálises e no embasamento científico do tratamento desta doença.

PALAVRAS-CHAVE: Cirurgia Colorretal; Enterocolite; Transplante de Células-Tronco.

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Crohn (DC) pode se manifestar com fistulização, podendo acometer a região perianal com fístulas complexas. A incidência cumulativa de pacientes com DC que desenvolvem fístulas perianais durante 20 anos de acompanhamento foi relatada em 20%, com o maior risco de desenvolver fístulas nos primeiros 10 anos após o diagnóstico. As fístulas perianais são frequentes e afetam criticamente a qualidade de vida do paciente devido à ocorrência de dor, secreções purulentas, formação de abscesso, incontinência anal, constrangimento pessoal e o comprometimento das funções físicas e sexuais.

Recentemente, terapias com células-tronco (CTs) têm mostrado efeitos promissores. A redução da capacidade de regenerar e reparar o organismo estão relacionados com o acúmulo das células-tronco adultas danificadas e senescentes, com capacidade de secreção de fatores e de diferenciação celular comprometida. Consequentemente surge a ineficiência dessas células em repor componentes celulares perdidos nos tecidos, associada à desregulação de respostas de outras células, como as do sistema imune, para o reparo e a manutenção dos tecidos. Como resultado há um aumento de processos inflamatórios que afetam a função e a dinâmica tecidual no organismo, culminando em cicatrização mais lenta e inadequada.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 TIPO DE ESTUDO

Estudo randomizado duplo-cego com análise descritiva dos dados e avaliação de possível diferença através de regressão logística com medidas repetidas.

2.2 AMOSTRAGEM

Nesta pesquisa a população será constituída de vinte pacientes que forem atendidos em ambulatório de coloproctologia da UNICESUMAR, Hospital Municipal de Maringá e Centro de referência em Coloproctologia vinculado ao programa de Residência médica de Coloproctologia do Hospital Santa Rita na cidade de Maringá, Paraná. Os pacientes deverão apresentar o diagnóstico de fístula perianal decorrente de doença de Crohn, submetidos ou não a outras modalidades de tratamento prévio. Metade do grupo será selecionado aleatoriamente para receber as células tronco cultivadas, totalizando 10 pacientes, e outros 10 pacientes receberão placebo (solução salina). A seleção para os grupos ocorrerá de forma aleatória e com duplo cegamento, cujo paciente em estudo e a equipe médica envolvida não saberão a qual grupo pertencem até o final do estudo. As amostras para a realização do procedimento serão designadas pelo laboratório do Hospital Almodim, localizado na cidade Maringá - Paraná. O hospital é especializado na área de genética, cultivo celular e criopreservação.

2.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Serão inclusos todos os pacientes com diagnóstico de doença de Crohn e portadores de fístula perianal podendo ou não terem recebido outra modalidade de tratamento prévio e que assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido. Tais pacientes se forem do sexo feminino, deverão ter teste de beta-HCG negativo.

2.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Serão excluídos os participantes que tenham diagnóstico de outras doenças autoimunes ou doença inflamatória intestinal que não sejam a doença de Crohn, ou com alergia e hipersensibilidade a materiais derivados de anestésicos ou bovinos. Pacientes com diagnóstico de doenças infecciosas ou doenças sexualmente transmissíveis ativas ou tuberculose ativa também serão excluídos do estudo.

Os pacientes com sinais ou sintomas de infecção ativa ou septicemia também serão excluídos do estudo, e pacientes com histórico clinicamente relevante de abuso de álcool ou drogas.

2.5 MÉTODOS DE COLETA DE DADOS

2.5.1 Obtenção das células

Inicialmente, para obtenção das células, será realizada a lipoaspiração da região subcutânea abdominal anterior sob anestesia local, na qual serão obtidos cem mililitros de aspirado do tecido adiposo. O aspirado será então transferido para tubos com 0,05% de colagenase (GIBCO, Invitrogen, USA) em meio de cultivo de células - DMEM (GIBCO, Invitrogen, USA), no qual permanecerá por 1 hora na temperatura de 37°C. O material será posteriormente centrifugado a 200 G por 10 minutos e lavado duas vezes com solução

tampão fostato - DPBS (GIBCO, Invitrogen, USA). O precipitado resultante será então colocado em suspensão novamente e alocado em frascos de 25 ml contendo 5 mL de meio de cultura basal, meio DMEM enriquecido com bicarbonato de sódio (2 g/l) e glutamina (2 mM/l), 10% de soro autólogo, 50 µg/mL de gentamicina (Sigma-Aldrich) e 2,5 µg/mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich). Os frascos serão mantidos em estufa na temperatura de 37°C e com 5% de CO₂.

As células serão caracterizadas como CTTAs por imunofenotipagem através de citometria de fluxo pela análise da expressão das moléculas de superfície celular como o CD29, CD44, CD73, CD34 e CD45 e do complexo de histocompatibilidade principal HLA-ABC e HLA-DR. As células serão também identificadas como CTTAs por procedimentos de diferenciação de tais células em condrócitos, osteócitos e adipócitos, utilizando meios de cultivo específicos para estas linhagens.

2.5.2 Aplicação das CTTAs

O procedimento de aplicação das CTTAs será realizado concomitante ao tratamento cirúrgico da fistula perianal convencional, não acarretando custos extras ao sistema público de saúde ou privado. O procedimento ocorrerá nos centros cirúrgicos dos serviços ligados ao programa de residência médica em Coloproctologia do Hospital São Marcos/Hospital Municipal/Hospital Santa Rita na cidade de Maringá, Paraná. Paciente receberá raquianestesia em ambiente de centro cirúrgico, em seguida será posicionado em posição de litotomia, com a realização rotineira de antisepsia, assepsia e colocação de campos cirúrgicos estéreis. O cirurgião responsável identificará o trajeto fistuloso para realizar curetagem do mesmo e lavagem com solução fisiológica 0,9% e, posteriormente, será realizada a injeção de 20 milhões de CTTAs viáveis. Para finalizar o procedimento, será realizada revisão da hemostasia e curativo local.

2.5.3 Análise do fechamento da fístula

A análise será realizada através do exame físico minucioso, repetido mensalmente no período de 6 meses e, ao término desse período, será associada ao método de imagem (ressonância magnética pélvica) para confirmar a resolução da fístula em pacientes que apresentaram cicatrização completa.

2.6 MÉTODOS DE PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE DADOS

Os dados serão tabulados, classificados e apresentados em forma de tabelas, gráficos e planilhas eletrônica, usando recursos de informática (Microsoft Excel® e Microsoft Word®). Posteriormente será realizada a avaliação dos dados obtidos e da possível diferença encontrada entre os grupos utilizando regressão logística com medidas repetidas. O software para análise estatística será o EPI INFO versão 7.2 (2018), desenvolvido pelo CDC (Centers for Disease Control and Prevention).

2.7 ASPECTOS ÉTICOS

Trabalho aprovado pelo comitê de ética da UniCesumar sob CAAE: 43337920.1.0000.5539. O presente projeto seguirá todos os procedimentos éticos de pesquisa e não implicarão em qualquer risco físico, psicológico ou moral ou prejuízo aos indivíduos participantes. O estudo cumprirá as “Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos” (196/96) editadas pela Comissão Nacional de

Saúde. Os dados coletados somente serão utilizados para fins de pesquisa, sendo resguardada a identidade dos sujeitos da pesquisa conforme resolução 196/96.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente pesquisa possui limitações. A randomização sequencial poderá selecionar grupos diferentes de acordo com o sexo, idade e IMC, ocorrendo um viés de seleção. Outra limitação presente é a gravidade inicial da Doença de Crohn de cada paciente, variando a manifestação clínica de cada indivíduo.

Diante de uma patologia complexa como a Doença de Crohn, em que complicações como as lesões perianais apresentam-se de forma desafiadora pela dificuldade apresentada no tratamento, e visto que apesar de existir uma variedade de tratamentos disponíveis, a falha terapêutica ou as remissões das fístulas perianais não são RARAS, pretendemos com o nosso estudo mostrar que a injeção de CTTAs apresenta benefícios na diminuição do processo inflamatório tecidual, regeneração celular e reparo tecidual em trajetos de fístulas perianais em pacientes portadores de Doença de Crohn. Os resultados deste projeto poderão servir de base para melhorar aplicações clínicas da medicina regenerativa com células-tronco no tratamento de lesões e fístulas perianais.

REFERÊNCIAS

Allal, A.S., Bieri, S., Pelloni, A. et al. Sphincter-sparing surgery after preoperative radiotherapy for low rectal cancers: feasibility, oncologic results and quality of life outcomes. *British Journal of Cancer*. 2000; 82: 1131–1137

CORMAN ML. *Corman's Colon and Rectal Surgery*, Sixth Edition. Ed. Lippincott Williams & Wilkins.

Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013;49:1374-403. 10.1016/j.ejca.2012.12.027

Glimelius B. Radioterapia neo-adjuvante em câncer de reto. *World J Gastroenterol* . 2013 14 de dezembro;

Kim SH. Computed tomography enterography and magnetic resonance enterography in the diagnosis of Crohn's disease. *Intest Res*. 2015;13:27-38

Orholm M, Binder V, Sorensen TL, et al. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol*. 2000;35:1075

Räsänen M, Carpelan-Holmström M, Mustonen H, et al. Pattern of rectal cancer recurrence after curative surgery. *Int J Colorectal Dis* 2015;30:775-85. 10.1007/s00384-015-2182-1

Sauer, R., Becker, H., Hohenberger, W. et al. German Rectal Cancer Study Group Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *New England Journal of Medicine*. 2004; 351: 1731–1740

Van Gijn W, Marijnen CA, Nagtegaal ID, et al. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer: 12-year follow-up of the multicentre,

randomised controlled TME trial. Lancet Oncol 2011;12:575-82. 10.1016/S1470-2045(11)70097-3